



UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Biologiczno-Chemiczny

Instytut Chemii



Prof. dr hab. Beata Godlewska-Żyłkiewicz

15-245 Białystok, ul. K. Ciołkowskiego 1, ☎ / fax (85) 7388257; 7470113

e-mail: bgodlew@uwb.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Anny Marcinkowskiej

**„Wielopierwiastkowa analiza specjacyjna wody zaawansowaną techniką
sprzężoną HPLC/ICP-DRC-MS”**

Analiza specjacyjna pierwiastków w materiałach naturalnych to specyficzny i trudny obszar chemii analitycznej, a jej wyniki wykorzystywane są w wielu dziedzinach nauki. O szczególnej trudności analizy, oprócz niskich zawartości form specjacyjnych pierwiastków w badanych próbkach, stanowią: bogactwo występujących form, ich różna trwałość, zdolność do transformacji oraz konieczność pobrania próbki i wstępnego rozdzielania induwiduów bez zmiany formy chemicznej. Analiza taka wymaga najczęściej wykorzystania wysokorozdzielczych technik separacyjnych oraz technik oznaczania o niskich granicach oznaczalności analitów. W ostatnich latach w literaturze światowej obserwować można szybki rozwój badań związanych z wykorzystaniem w takich badaniach technik sprzężonych. O układzie/technice sprzężonej mówimy wówczas, gdy technika oznaczania jest bezpośrednio połączona z techniką rozdzielania za pomocą elementu łączącego. Wybór detektora jest uwarunkowany celem analizy, poziomem stężeń oznaczanych form chemicznych, a także możliwością jego połączenia z układem rozdzielania, co jest związane m.in. z szybkością przepływu fazy ruchomej, jej właściwościami chemicznymi, czy zawartością soli nieorganicznych. Dodatkową trudność może stanowić występowanie interferencji w etapie oznaczania. Wielopierwiastkowa analiza specjacyjna, to zadanie jeszcze trudniejsze, bo należy tak zoptymalizować warunki rozdzielania form specjacyjnych oraz warunki oznaczania, aby możliwe było oznaczanie kilku pierwiastków jednocześnie. Kolejnym wyzwaniem jest zapewnienie jakości oznaczeń, a zwłaszcza spójności pomiarowej. Rutynowo stosowane są do tego celu certyfikowane materiały odniesienia (CRM), jednak dostępność materiałów przeznaczonych do analizy specjacyjnej jest bardzo ograniczona.

Mgr Monika Anna Marcinkowska w swojej pracy doktorskiej podjęła się opracowania procedur analitycznych pozwalających na wielopierwiastkową analizę specjacyjną wody przeznaczonej do spożycia. W obszarze jej zainteresowań znalazły się pierwiastki, których formy specjacyjne różnią się toksycznością w stosunku do organizmu człowieka, anionowe formy As (III) i As(V), Cr(III) i Cr(VI) oraz Sb(III) i Sb(V). Zadanie to było możliwe dzięki zastosowaniu techniki sprzężonej – wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) połączonej ze spektrometrią mas z

jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS). Do eliminacji interferencji spektralnych podczas oznaczania jonów metali wykorzystano dynamiczną komorę reakcyjną (DRC). Opracowane procedury wykorzystano w praktyce do analizy specjacyjnej arsenu, antymonu i chromu w wodzie przeznaczony do spożycia.

Tematyka badań prowadzonych przez mgr Monikę Marcinkowską jest aktualna i wpisuje się w najnowsze trendy rozwoju chemii analitycznej. Na szczególne podkreślenie zasługuje również aspekt praktyczny i metrologiczny badań, gdyż Doktorantka duży nacisk położyła na zapewnienie jakości wyników. Praca doktorska wykonana została w Pracowni Analizy Spektroskopowej Pierwiastków Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem bardzo doświadczonego badacza, eksperta w zakresie analizy specjacyjnej, prof. dr hab. Danuty Barańkiewicz. Promotorem pomocniczym pracy była dr Izabela Komorowicz.

Ocena konstrukcji i zakresu badań przedstawionych w rozprawie

Rozprawa doktorska mgr Moniki Marcinkowskiej ma formę spójnego tematycznie zbioru pięciu artykułów, z czego cztery prace zostały opublikowane w latach 2013-2016 w międzynarodowych czasopismach naukowych. Ostatnia z cyklu prac została przyjęta do druku. Wszystkie prace znajdują się w czasopismach indeksowanych w bazie JCR (Journal Citation Reports), o sumarycznym współczynniku oddziaływania (Impact Factor; IF) 16,685 (suma punktów MNiSW: 180). Pierwsza praca ukazała się w czasopiśmie Accreditation and Quality Assurance w 2013 roku (18, 391-401), druga w 2015 roku w czasopiśmie Talanta (144 (2015) 233-240), kolejne dwie w 2016 roku w Analytica Chimica Acta (920 (2016) 102-111) i Talanta (161 (2016) 177-2014). Ostatnia praca ukazuje się w roku 2017 w Microchemical Journal. Prace przedstawione w rozprawie są wieloautorskie – pierwsza z nich liczy czterech, a pozostałe dwóch lub trzech współautorów. Należy zaznaczyć, że Doktorantka jest pierwszym autorem czterech artykułów, a w jednym z nich jedynym współautorem jest promotor rozprawy, prof. Danuta Barańkiewicz. Do rozprawy doktorskiej dołączono oświadczenia wszystkich współautorów publikacji, z których wynika, że Doktorantka miała dominujący udział (60-70%) w powstaniu i opublikowaniu 4 przedłożonych prac, zaś w pierwszej (chronologicznie) z opublikowanych prac jej udział wynosił 20%.

Wszystkie artykuły zamieszczone w rozprawie doktorskiej zostały wcześniej poddane wnikliwej i rygorystycznej recenzji wymagających specjalistów i edytorów naukowych, co niewątpliwie ułatwia pracę recenzentowi rozprawy, jednak nie zwalnia go od obowiązku dokonania własnej analizy i oceny.

Praca przedstawiona jako **Załącznik I** rozprawy doktorskiej zawiera przegląd literatury dotyczącej wielopierwiastkowej analizy specjacyjnej przygotowany na podstawie 99 pozycji. Przegląd rozpoczyna zwięzłe uzasadnienie celowości prowadzenia analizy specjacyjnej w aspekcie różnej toksyczności form specjacyjnych metali, ich biodostępności oraz badań metabolizmu metali w organizmach. Opisane są również wzajemne interakcje pierwiastków w organizmach, powodujące zmianę ich formy chemicznej, a w efekcie zmianę działania danego metalu na organizm w obecności innych pierwiastków oraz formy specjacyjne arsenu, chromu, selenu, rtęci i antymonu

występujące w środowisku wraz z odpowiednimi regulacjami prawnymi dotyczącymi ich zawartości w wodach, żywności i produktach użytkowych. Przedstawione są również zalety wykorzystania sprzężonej techniki HPLC/ICP-MS w wielopierwiastkowej analizie specjacyjnej pierwiastków. Część druga pracy zawiera przegląd procedur analitycznych opracowanych w celu wielopierwiastkowej analizy specjacyjnej techniką HPLC/ICP-MS. Doktorantka zauważa, że od roku 1992 ukazało się ok. 40 takich prac, jednak większość z nich (70%) dotyczy jednoczesnego oznaczania form specjacyjnych dwóch pierwiastków, jedynie kilka prac przedstawia procedury oznaczania czterech i więcej pierwiastków. Na tym tle należy tym bardziej docenić osiągnięcie Doktorantki w zakresie opracowania procedur jednoczesnego oznaczania form chemicznych trzech pierwiastków. W przeglądzie uwzględnione zostały warunki chromatograficznego rozdzielania form specjacyjnych pierwiastków oraz ich oznaczania techniką ICP-MS, z uwzględnieniem rodzaju występujących interferencji oraz sposobów ich eliminacji z wykorzystaniem komór kolizyjnych i reakcyjnych, dodatku wzorca wewnętrznego, korekcji matematycznej oraz metod chromatograficznych. W tabeli 3 podane są również parametry charakteryzujące opracowane procedury, takie jak: granica wykrywalności, precyzja oznaczania oraz odzysk. Istotna część przeglądu dotyczy bardzo ważnych zagadnień związanych z analizą specjacyjną metali w próbkach ciekłych i stałych, a mianowicie procedur pobierania próbek do badań, ich konserwacji, przechowywania oraz przygotowania do analizy. Przykłady ilustrujące te zagadnienia zamieszczono w obszernych tabelach. Krótko poruszony jest również aspekt metrologicznego zapewnienia jakości wyników, co jest niezwykle trudne przy braku odpowiednich materiałów odniesienia przeznaczonych do takich badań.

W mojej opinii praca ta stanowi zwięzłe i w pełni wystarczające wprowadzenie do poruszanej w rozprawie tematyki, przedstawiając obecny stan badań w obszarze wielopierwiastkowej analizy specjacyjnej oraz problemy występujące podczas takiej analizy. Treści w niej zawarte uzasadniają cel podjęcia badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej. Praca ta świadczy też o ogólnej wiedzy Doktorantki z zakresu chemii analitycznej, a szczególnie obszaru analizy specjacyjnej..

W części doświadczalnej mgr Monika Anna Marcinkowska zajęła się analizą specjacyjną chromu, arsenu i antymonu, pierwiastków, których formy chemiczne są toksyczne dla człowieka.

Badania własne Doktorantka rozpoczęła, ujmując rzecz chronologicznie, od zagadnień metrologicznych, skupiając się na identyfikacji źródeł niepewności wyników oznaczeń form specjacyjnych chromu (Cr(III) i Cr(VI)) prowadzonych za pomocą techniki sprzężonej (HPLC/ICP-MS). Wnikliwie przeanalizowała budżety niepewności wyników pomiarów otrzymanych dwoma sposobami szacowania niepewności, a mianowicie na podstawie równania modelowego z zastosowaniem prawa propagacji niepewności oraz na podstawie danych pomiarowych otrzymanych w procesie walidacji metody analitycznej (**Załącznik V**). Praca ta świadczy, że mgr Marcinkowska zdobyła dobry warsztat metrologiczny, który efektywnie wykorzystywała w dalszej pracy badawczej.

W publikacji stanowiącej **Załącznik II** Doktorantka opracowała metodę jednoczesnego oznaczania anionowych form chromu(VI) i arsenu (As(III), As(V)) w

wodzie. Szczególną uwagę poświęciła optymalizacji warunków pracy komory reakcyjnej spektrometru mas w celu zredukowania interferencji poliatomowych podczas oznaczania obu analitów. Jako gaz reakcyjny wybrała tlen, który zapewniał ilościową konwersję jonu $^{75}\text{As}^+$ w $^{91}\text{AsO}^+$, redukując w ten sposób występowanie interferencji podczas oznaczania arsenu. Zoptymalizowała również warunki chromatograficznego rozdzielania badanych jonów na kolumnie anionowymiennej. Zaproponowała dwie procedury elucji izokratycznej z zastosowaniem wodorofosforanu(V) diamonu oraz azotanu(V) amonu o różnych stężeniach, w zależności od stężenia badanych jonów w próbkach (trwające 6 lub 3 minuty). Obie opracowane procedury analityczne zostały poddane walidacji. Procedury te są krótsze, niż opublikowane w literaturze.

Kolejnym etapem Jej badań było opracowanie metody oznaczania form specjacyjnych chromu, arsenu i antymonu (w postaci: H_3AsO_3 , H_2AsO_4^- , SbO_2^- , $\text{Sb}(\text{OH})_6^-$, CrO_4^{2-}) w wodach przeznaczonych do spożycia (**Załącznik III**). Doktorantka ponownie zoptymalizowała warunki pracy komory reakcyjnej z wykorzystaniem tlenu jako gazu reakcyjnego, pod kątem jednoczesnego oznaczania techniką ICP-MS następujących izotopów: $^{91}\text{AsO}^+$, $^{52}\text{Cr}^+$, $^{123}\text{Sb}^+$. Wyboru izotopów oraz szybkości przepływu gazu reakcyjnego dokonała na podstawie oceny dokładności oznaczeń pierwiastków w dwóch materiałach odniesienia. Podjęła również próbę eliminacji interferencji metodą dodatku wzorca wewnętrznego (germanu i rodu), ale obecność wzorca nie poprawiła dokładności oznaczeń. Do rozdzielania form specjacyjnych na kolumnie anionowymiennej zastosowała elucję gradientową, stosując jako fazę mobilną EDTA w formie soli sodowej oraz azotan(V) amonu. Aspekt doboru fazy mobilnej oraz programu elucji gradientowej został bardzo wnikliwie przeanalizowany i przedyskutowany w kontekście analizowanych form pierwiastków, doboru składników fazy mobilnej, ich stężenia, wpływu fazy mobilnej na sygnał tła w wyniku tworzenia jonów interferujących, maksymalnej wartości sygnałów pomiarowych, a także czasu trwania analizy. Opracowaną procedurę poddano walidacji. Praktyczną użyteczność procedury potwierdzono stosując ją do oznaczenia badanych form specjacyjnych pierwiastków w wodzie o niskiej zawartości składników mineralnych. Praca ta jest bardzo wartościowa, z praktycznego i naukowego punktu widzenia, gdyż w sposób kompleksowy pokazuje prawidłowy tok prac eksperymentalnych oraz wnioskowania w trakcie optymalizacji procedur analitycznych, zarówno rozdzielania jak i oznaczania form specjacyjnych. Korzystając z Tabeli 3 zamieszczonej w publikacji przeglądowej (**Załącznik I**) łatwo można odnaleźć miejsce opracowanych procedur na tle literatury światowej. W trakcie lektury zauważyłam, że niepełny jest opis rysunku 3 w pracy stanowiącej **Załącznik III**. Proszę również o wyjaśnienie, czy podczas prób identyfikacji sygnału rejestrowanego dla izotopu ^{52}Cr przy czasie retencji 9 min., wykonano eksperyment polegający na dodaniu do próbek/roztworów wzorcowych jonów Cr(III), o których wiadomo, że tworzą anionowe kompleksy z obecnym w fazie mobilnej EDTA.

Dalsza część pracy mgr Marcinkowskiej dotyczy badania wpływu rodzaju materiału pojemnika na zawartość anionowych form specjacyjnych chromu, arsenu i antymonu w butelkowanych wodach mineralnych (**Załącznik IV**). W badaniach Doktorantka wykorzystwała opracowaną wcześniej procedurę HPLC/ICP-DRC-MS, jednak z powodu dużej zawartości matrycy nieorganicznej w oznaczanych wodach

mineralnych, wymagała ona reoptymalizacji, między innymi w zakresie wyboru techniki kalibracji. Przeprowadziła również walidację procedury oraz wyznaczyła niepewność stężenia pierwiastków w wodach stosując, wybraną na podstawie wcześniejszych badań (Załącznik V) i prostszą w wykonaniu, metodę opartą na parametrach wyznaczonych podczas walidacji metody. Doktorantka wykazała, że źródłem Cr(VI) w wodzie są butelki w kolorze zielonym szklane i wykonane z tworzywa PET, źródłem arsenu butelki szklane, a Sb(V) butelki wykonane z PET.

Jak wspomniałam wcześniej, w ocenianej rozprawie znalazła się również praca metrologiczna (**Załącznik V**), dotycząca szacowania budżetu niepewności oznaczania specjacji chromu w wodzie pitnej metodą chromatografii par jonowych w odwróconym układzie faz z oznaczaniem techniką ICP-MS (IP-RP-HPLC/ICP-MS). Praca ta nie jest bezpośrednio związana z tematyką rozprawy doktorskiej, gdyż nie dotyczy wielopierwiastkowej analizy specjacyjnej, zatem bez uszczerbku dla całości rozprawy mogłaby być z niej wyłączona.

Podsumowując konstrukcję i zakres badań przedstawionych w rozprawie stwierdzam, że konstrukcja pracy jest właściwa, zaś badania zostały zaplanowane i przeprowadzone w sposób metodycznie poprawny i logicznie opisane. Doktorantka wykazała również praktyczną użyteczność opracowanych procedur analitycznych. Znaczna część rozprawy poświęcona jest zapewnieniu jakości wyników pomiarów, co jest niezwykle ważne we współczesnej chemii analitycznej. Wysoką wartość pracy podkreśla opublikowanie jej wyników w renomowanych czasopismach analitycznych. Założone przez Doktorantkę ambitne cele rozprawy zostały w pełni zrealizowane.

Ocena redakcyjnej strony pracy:

Pod względem redakcyjnym rozprawa została przygotowana poprawnie. Zamieszczone w niej publikacje (Załączniki I-V) zostały poprzedzone streszczeniem, w języku polskim i angielskim, wstępem oraz życiorysem naukowym Doktorantki i spisem Jej dorobku naukowego. Wstęp zawiera opisane cele i założenia pracy, genezę badań, a także przebieg prac badawczych prowadzonych podczas wykonywania pracy doktorskiej Doktorantka we wstępie odwołuje się do tabel i rysunków zamieszczonych w opublikowanych pracach (Załączniki II-V), a w niektórych przypadkach uzupełnia ich treść o wyniki badań, które w publikacjach nie zostały umieszczone. Dyskusja badań przeprowadzona została kompleksowo. W końcowej części wstępu zamieszczono wypunktowane podsumowanie odnoszące się do założonych celów pracy. Czytelnik otrzymuje więc ciekawe i zwięzłe przedstawione rozważania, których lektura przekonuje zarówno o rozległej wiedzy Doktorantki, jak i umiejętności dokonania przez nią syntezy uzyskanych wyników i przedstawienia ich w szerszym kontekście.

Praca przygotowana jest starannie, bogato ilustrowana, napisana poprawnym językiem. Pewne potknięcia terminologiczne i pomyłki podaję poniżej.

Niepoprawnie zostały podane nazwy związków chemicznych: trójtlenek antymonu, trójchlorek antymonu, antymonyl potasu winianu;

Ponadto: we Wstępie brak jest objaśnienia skrótu DRC (str. 13 i dalsze), L_D, L_O (str.18), CRM (str. 18), R_{pq} i R_{pa} (str. 21); w tabeli 2 załącznika III (str. 106 publikacji) jako

monitorowany izotop pojawia się ^{123}Sb , natomiast we wstępie podana jest informacja, że do badań wybrano izotop ^{121}Sb (str. 20); błędnie podpisany jest rysunek 1 ilustrujący funkcję intensywności sygnału w funkcji przepływu amoniaku na str. 22;

W procesie druku rozprawy doktorskiej pojawiły się pewne braki, które w jej wersji elektronicznej nie występują, np. brakuje części wersów na str. 15, 20, 31, 33; brakuje części ostatnich wersów w przedostatniej kolumnie Tabeli 1 (Załącznik 1).

Wnioski

Kończąc recenzję podkreślę, że oceniana rozprawa prezentuje wysoki poziom naukowy. Mgr Monika Anna Marcinkowska przeprowadziła w niej kompleksową optymalizację wielopierwiastkowych procedur analizy specjacyjnej z wykorzystaniem techniki sprzężonej HPLC/ICP-MS, zadbała również o zapewnienie wysokiej jakości metrologicznej wyników pomiarów, a zatem ich praktyczną użyteczność. Jestem przekonana, że opublikowane wyniki rozprawy znajdą oddźwięk w pracach innych badaczy prowadzących badania w tej dziedzinie. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez nią badań naukowych, spełnia zatem wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art.13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r.*

We włączonych do rozprawy czterech pracach badawczych Doktorantka pełni dominującą rolę, co w pełni uzasadnia wniosek o nadanie Jej stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Wnoszę więc do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Moniki Anny Marcinkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników oraz ich opublikowanie w uznanych czasopismach, stawiam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.



Białystok, 5.01.2017 r.